



09/383,318

# 12

**REPUBLIQUE TUNISIENNE**

\*\*\*\*\*

**INSTITUT NATIONAL DE LA NORMALISATION ET DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE  
-INNORPI-**

# **BREVET D'INVENTION**

## **COPIE OFFICIELLE**

LE DIRECTEUR GENERAL DE L'INSTITUT NATIONAL DE LA NORMALISATION ET  
DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE CERTIFIE QUE LE DOCUMENT CI-ANNEXE EST  
LA COPIE CERTIFIEE CONFORME DE LA DEMANDE DE BREVET D'INVENTION  
NUMERO SN99100 DEPOSEE LE 26.05.1999.

Tunis, le 13 JUIN 2000

LE DIRECTEUR GENERAL  
DE L'INNORPI

Abderrazak GUARDA

**INSTITUT NATIONAL DE LA NORMALISATION ET DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE  
-INNORPI-**

Cité El Khadhra - TUNISIE

Tel : 785.922 - Téléc : 13602 INNORPI TN Téléfax : 781.562



DEPARTEMENT DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE

CITE EL KHADHRA PAR LA RUE ALAIN SAVARY - 1003 TUNIS - TEL : 785.922 - FAX 781.563

----- \* -----  
REGISTRE D'ARRIVEE DES DEMANDES DE BREVETS D'INVENTION

----- \* -----  
RECEPISSE DE DEPOT D'UNE DEMANDE DE BREVET D'INVENTION  
----- \* -----

DATE D'ARRIVEE DE LA DEMANDE 1999.05.26 Heure : 16H35 mn No D'INSCRIPTION SN99.100

LE DIRECTEUR GENERAL DE L'INSTITUT NATIONAL DE LA NORMALISATION ET DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE,  
ATTESTE AVOIR ACCUSE RECEPTION DE : LE CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE SFAX /

Adresse : BP K 3038 SFAX TUNISIE/

Mandataire : MONSIEUR SAMIR BEJAR

Adresse BP K 3038 SFAX TUNISIE

AUX DATE ET HEURE SUS-INDIQUEES, DES PIECES SUIVANTES :

- UNE DEMANDE VISANT A L'OBTENTION D'UN BREVET D'INVENTION DE : VINGT ANS

ayant pour titre : ORIGINALITE DE LA GLUCOSE ISOMERASE DE LA SOUCHE.

STREPTOMYCES SP. SK : CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ET DE LA PROTEINE ET  
UTILISATION DE L'ENZYME POUR LA BIOCONSERVATION DE SIROP DE GLUCOSE EN  
SIROP D'ISOGULOSE.

ET POUR INVENTEUR (S) : KARIMA SRIH-BELGUITH, MONIA MEZGHANI, RADHOUANE ELLOUZ, SAMIR BEJAR,

- DEUX EXEMPLAIRES EN FRANCAIS DE LA DESCRIPTION DE L'INVENTION OBJET DE LA DEMANDE.

- 05 DESSINS QU'IL A JUGES NECESSAIRES A L'INTELLIGENCE DE LA DESCRIPTION EN DOUBLE EXEMPLAIRE.

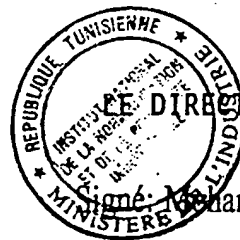
- UN BORDEREAU DES PIECES DEPOSEES

- LA PIECE JUSTIFICATIVE DU PAIEMENT DES REDEVANCES PRESCRITES EN MATIERE DE DEPOT.

- UN POUVOIR

LE DEPOSANT

*Bejar Samir*



LE DIRECTEUR GENERAL

*Hammed* CHAOUCH



Sfax le 26 Mai 1999

**DEMANDE DEPOSEE AU NOM DU :** Centre de Biotechnologie de Sfax

**INVENTEURS:** Karima SRIH-BELGUITH, Monia MEZGHANI, Radhouane ELLOUZ et  
Samir BEJAR

**TITRE:** Originalité de La Glucose Isomérase de la souche *Streptomyces* sp. SK:  
caractérisation de l'activité et de la protéine et utilisation de l'enzyme pour la  
bioconversion de sirop de glucose en sirop d'isoglucose.



# LA GLUCOSE ISOMERASE DE LA SOUCHE DE *STREPTOMYCES* SP. SK

## DESCRIPTION DETAILLEE

L'invention concerne une glucose isomérase de propriétés physico-chimiques intéressantes pouvant être exploitée à l'échelle industrielle. Dans sa forme générale, ce brevet concerne la production et l'exploitation des enzymes d'intérêt industriel dans le domaine de l'agro-alimentaire.

L'invention a pour objet le criblage, la caractérisation et l'utilisation d'une glucose isomérase ayant des caractéristiques originales. Elle concerne également le clonage et le séquençage du gène correspondant ainsi que l'analyse de la séquence en aa de l'enzyme.

Les glucoses isomérases sont également connues sous le nom de xylose isomérase puisque, in vivo, le rôle connu de ces enzymes est la bio-conversion du xylose en xylulose lequel sera utilisé dans le cycle des pentoses. C'est en fait la réaction d'isomérisation de glucose en fructose qui a un intérêt industriel puisqu'elle est exploitée pour la bioconversion de sirop de glucose en sirop d'isoglucose un mélange de glucose et de fructose. En effet, au cours de cette bioconversion il y a formation d'un mélange équilibré de glucose et de fructose. Pour déplacer cet équilibre en faveur du fructose, il faudrait travailler à haute température. Cependant, il est également souhaité de maintenir un pH relativement bas faute de quoi des réactions secondaires productrices de produits amères vont s'opérer.

Il existe actuellement plusieurs glucose isomérases ayant une température optimale de fonctionnement très élevée, telles que celles étudiées à partir de *Streptomyces flavovirens*, *Streptomyces olivochromogenes*, *Streptomyces violaceoniger*, *Lactobacillus brevis*. Cependant, la totalité de ces enzymes ont un pH optimum relativement élevé (7.5 à 9). Ceci a pour conséquence de limiter l'utilisation de ces enzymes ou d'abaisser la température d'isomérisation ce qui réduit l'efficacité de la réaction. La glucose isomérase de la souche *Streptomyces* sp. SK possède à la fois une température optimale élevée et un pH optimum bas.

Sous sa forme spécifique, cette invention est caractérisée par les étapes suivantes:

- a) l'isolement d'une souche de *Streptomyces* ayant une glucose isomérase à partir d'un échantillon de sol Tunisien
- b) la détermination des propriétés physico-chimiques de l'enzyme
- c) l'utilisation de la souche et de l'enzyme pour la bioconversion d'une solution de glucose pure en solution d'isoglucose (mélange de glucose et de fructose) ou d'un sirop de glucose en sirop de fructose
- d) le clonage du gène codant pour cette enzyme dans une souche modèle de *E.coli*.
- e) la détermination de la séquence nucléotidique de ce gène ainsi que la déduction de la séquence en aa de l'enzyme.
- f) l'analyse de la séquence en aa de l'enzyme et la mise en évidence de l'originalité de cette séquence.

L'étape (a) a consisté en l'isolement de la souche *Streptomyces* sp. SK à partir d'échantillons de sols de sources d'eaux chaudes Tunisiennes. Nous avons isolé plusieurs souches thermophiles d'actinomycètes sur des milieux de sélection contenant le xylose comme unique source de carbone. Toute souche qui pousse sur ce type de milieu est sensée

posséder une activité glucose isomérase. Les études préliminaires sur les activités glucose isomérases de ces différentes souches isolées nous ont incité à retenir une souche qui a été identifiée comme étant une souche de *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. SK ).

L'étape suivante (b) a consisté à déterminer les caractéristiques physico-chimiques de l'enzyme notamment le pH et la température optimum. La glucose isomérase de la présente invention est formée au sein des cellules bactériennes qui se développent pendant sa production. Les cellules peuvent être séparées par filtration ou par centrifugation du bouillon de culture et utilisées directement comme source d'isomérisation de glucose. Les cellules peuvent être aussi séparées par filtration puis rompues par des moyens bien connus. Les cellules rompues résultantes et leur contenu libéré peuvent être utilisés comme source d'isomérase de glucose.

Sur la figure 1 est montré l'effet du pH sur la glucose isomérase de la souche *Streptomyces* sp. SK. Cette étude montre que la GI SK tolère une large gamme de pH pour son activité et possède un pH optimum de 6 à 60°C et de 6.4 à 90°C. Cette caractéristique intéressante fait l'originalité essentielle de cette enzyme. En effet, ceci permet de réaliser l'étape d'isomérisation à un pH relativement bas ce qui empêche la formation de réactions secondaires génératrices de produits amères.

La GI SK possède aussi une température élevée. En effet, l'étude de l'effet de la température sur la GI SK montre (Figure 2) que l'enzyme est thermoactive puisque la température optimale est de 90°C et qu'elle retient environ 90% de son activité à 95°C.

L'étape suivante a consisté à démontrer la capacité de cette enzyme pour la bioconversion d'une solution de glucose en un mélange de fructose et de glucose. Pour se faire, nous avons utilisé dans l'exemple N°1 un extrait brut contenant l'activité glucose isomérase. Il est évident que l'utilisation de l'enzyme semi-purifiée ou purifiée sous sa forme libre et/ou immobilisée ou encore des cellules entières libres ou immobilisées est tout à fait possible et réalisable.

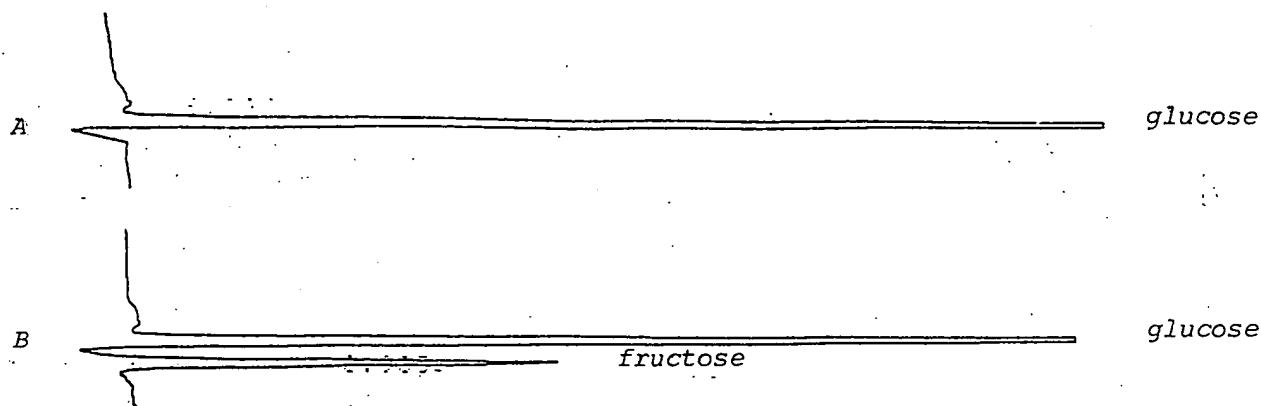
#### **Exemple N°1: bioconversion d'une solution de glucose pur en un mélange de glucose et de fructose**

La souche *Streptomyces* sp. SK possède une glucose isomérase très performante et capable de fonctionner à haute température et à un pH relativement bas. Cette souche a été cultivée selon des conditions bien déterminées. Par la suite, les cellules (mycélium) sont récupérées par centrifugation et sont éclatées selon un protocole bien défini. L'activité GI SK a été alors récupérée dans le surnageant après une ultracentrifugation. Cette préparation brute d'enzyme a été utilisée pour la bioconversion.

Les conditions de bioconversion utilisées sont les suivantes: à 5 ml d'une solution à 0.8 M glucose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM CoCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/maleate pH 6.4 est ajouté 200µl de la préparation enzymatique. La température est maintenue à 85°C pendant 120 min pour effectuer la bioconversion. Ensuite, la quantité de fructose formé est déterminée par la méthode chromatographique par HPLC. (Chromatogramme 1).



originale



Chromatogramme 1: spectre HPLC d'une solution de glucose pur avant bioconversion (A) et après bioconversion par la GI SK

Ce chromatogramme montre que la préparation enzymatique est capable de bioconvertir une partie du glucose en fructose. Cette bioconversion peut évidemment atteindre un maximum de 55% environ si on prolongeait le temps de la réaction et/ou si on mettait une quantité plus importante d'enzyme.

**Exemple N° 2: conditions de bioconversion d'un sirop de glucose DE>95 issu d'un hydrolysât de gruau par la GI SK et comparaison avec la GI type Q de NOVO industrie**

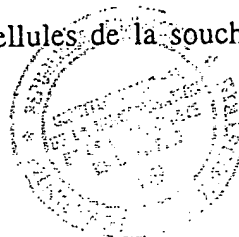
Dans cet exemple sont données à titre indicatif et non limitatif les conditions de bioconversion d'un sirop de glucose DE>95 obtenu à partir d'un hydrolysât amylolytique du gruau par la GI SK ou par la Glucose isomérase type Q de NOVO pris ici pour la comparaison

La composition approximative d'un sirop de glucose à DE>95 est la suivante:

DE	95 à 98
Glucose	94 à 96 %
Maltose	2 à 7 %
Autres maltodextrines	0 à 2 %

Dans cet exemple, nous avons utilisé en fait des cellules entières contenant l'activité GI SK. La souche est cultivée selon des conditions bien déterminées, puis les cellules ont été récupérées par centrifugation. Ces cellules sont utilisées sans aucun traitement préalable pour l'isomérisation en batch. Cependant, il est à noter que d'autres types de préparation enzymatique sous forme de cellules immobilisées ou d'enzymes libres (cas de l'exemple N°1) ou immobilisées peuvent être également utilisées selon des conditions adéquates.

Les conditions de bioconversion par les cellules de la souche *Streptomyces* sp. SK ou par l'enzyme type Q sont les suivantes:

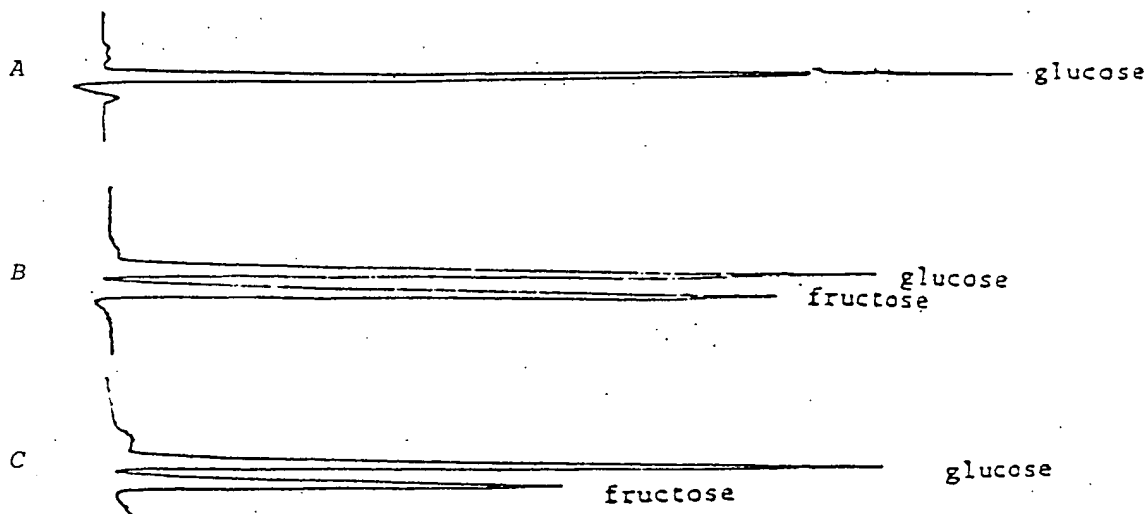


*originale*

A 15 millilitres d'une solution à 0.8 M glucose (sirop DE>95), 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM CoCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/maleate pH 6.4 est ajouté soit:

- 0.1 à 0.2 grammes de la préparation enzymatique dite Sweetzyme type Q commercialisée par NOVO-Industrie. C'est une préparation de cellules entières de *B. coagulans* immobilisées et conseillées pour une bioconversion en batch.
- 0.2 à 0.3 grammes de mycélium (à 13-15% de matière sèche) de la souche de *Streptomyces* sp. SK contenant la GI SK.

Le même nombre d'unités d'enzymes ont été utilisé pour chacune de ces deux expériences et la température est maintenue à 85°C pendant 120 min sous une agitation lente pour effectuer la bioconversion. Ensuite, l'isomérase insoluble, ayant réagi, est séparée de la solution par centrifugation, et la quantité de fructose ainsi produite a été déterminée selon le procédé chromatographique par HPLC (chromatogramme 2).



Chromatogramme 2: spectre HPLC d'un sirop de glucose à DE>95 avant l'isomérisation (A), après isomérisation avec la GI SK (B) et après isomérisation avec la GI Q (C)

Ce chromatogramme montre clairement que les cellules de *Streptomyces* sp. SK contenant la GI SK sont capables de bioconvertir un sirop de glucose à DE>95 (issue de l'hydrolysât du gruau dans notre cas) à un sirop d'isoglucose, un mélange de glucose et de fructose. Mieux encore, cet exemple montre qu'au pH utilisé (6.4) qui est tout à fait recherché pour une meilleure exploitation à l'échelle industrielle, le rendement de la bioconversion obtenue avec la GI SK est plus élevé que celui obtenu avec la GI Q et ce évidemment pour la même quantité d'enzyme (nombres d'unités) mise au départ. Ceci confirme évidemment la tolérance de la GI SK d'un pH bas.

L'étape suivante a consisté à cloner le gène codant pour la glucose isomérase de *Streptomyces* sp. SK. On sait déjà que le clonage du gène est une étape très importante qui permet une meilleure caractérisation de l'enzyme et la construction de souches sur-exprimantes de l'activité en question. Pour réaliser ce clonage, nous avons réalisé une banque génomique de la souche *Streptomyces* SK dans une souche de référence de *E.coli* et ce en utilisant un vecteur à nombre de copies élevé. Après criblage de la banque par une sonde

originale

spécifique, nous avons repéré un clone portant le plasmide pBSK1 (Figure 3) qui porte le gène *xylA* en entier codant pour la GI SK. La souche de *E.coli* portant le plasmide pBSK1 exprime aussi l'activité GI SK à l'intérieur de la cellule. Ceci rend possible l'exploitation de ces souches recombinantes ou dérivées pour la production de la GI SK.

Après avoir cloner le gène *xylA* SK, l'étape suivante a consisté à déterminer la séquence nucléotidique de ce gène afin d'en déduire la séquence en aa de l'enzyme. Pour se faire, l'insert de pBSK1 portant le gène *xylA* SK a été sous cloné dans des vecteurs appropriés. Par la suite, la séquence nucléotidique de 1546 paires de bases incluant le gène *xylA* SK a été déterminée (Figure 4) par les méthodes traditionnellement utilisées.

L'analyse de cette séquence nucléotidique a permis par la suite la mise en évidence d'une phase de lecture ouverte qui a été identifiée comme étant celle du gène *xylA* codant pour la GI SK. Cette phase de lecture code pour une protéine ayant un poids moléculaire théorique de 42.7 KDa. L'analyse de la séquence en aa de la protéine XYLASK a montré une homologie très importante avec d'autres glucoses isomérases (tableau 1) mais elle a montré également les originalités suivantes:

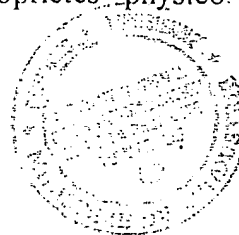
- 1- un taux d'acides aminés hydrophobes plus important que les autres xylose isomérases notamment en comparaison avec celles d'autres *Streptomyces* (tableau 1)

Tableau 1: comparaison de la GI SK avec d'autres glucose isomérases

Souches	Identité %	% d'aa hydrophobe.
<i>Streptomyces sp SK</i>	100	47.4
<i>S.olivochromogenes</i>	94.04	45.0
<i>S.violaceoniger</i>	92.49	46.1
<i>S.albus</i>	91.97	45.0
<i>Thermus thermophilus</i>	58.81	46.1
<i>B.subtilis</i>	13.21	46.6
<i>E.coli</i>	10.62	46.9

- 1- plusieurs changements dont les substitutions suivantes  $S_{63} \rightarrow A_{63}$ ,  $S_{70} \rightarrow A_{70}$ ,  $G_{103} \rightarrow A_{103}$ ,  $S_{333} \rightarrow A_{333}$  et  $E_{349} \rightarrow A_{349}$  (Figure 5).

Ces changements ainsi que le taux d'hydrophobicité élevé permettraient à l'enzyme une flexibilité plus importante ce qui explique la capacité de cette enzyme à fonctionner à des pH bas et à des températures élevées. Ainsi, aux propriétés physico-chimiques originales de l'enzyme sont associées une séquence originale.



*Be*



## Revendications

- 1- Une Glucose Isomérase de la souche de *Streptomyces* sp. SK (GI SK)
- 2- Une Glucose Isomérase, GI SK selon la revendication 1 incluant la souche sauvage *Streptomyces* sp. SK qui produit originellement cette enzyme.
- 3- Une Glucose Isomérase, GI SK selon la revendications 1 incluant la séquence en acides aminés de cette enzyme ainsi que la séquence nucléotidique correspondante.
- 4- Une Glucose Isomérase, GI SK selon les revendications 1 et 2 incluant tout autre gène codant pour une protéine glucose isomerase ayant une homologie supérieure ou égale à 95 % à la séquence du gène codant pour AmyUS100
- 5- Une Glucose Isomérase, GI SK selon les revendications 1 à 4 incluant tout autre glucose isomerase ayant une homologie supérieure ou égale à 98 % à la séquence de GI SK
- 6- Une Glucose Isomérase, GI SK selon les revendications 1 à 5 incluant la substitution spécifique suivante  $G_{103} \rightarrow A_{103}$
- 7- Une Glucose Isomérase GI SK selon les revendications 1 à 6 incluant toutes autres souches recombinantes. Nous entendons par souches recombinantes toutes souches de n'importe quelle espèce contenant le gène qui code pour la GI de la souche de *Streptomyces* sp. SK.
- 8- Une Glucose Isomérase, GI SK selon les revendications 1 à 7 incluant toutes utilisations de cette enzyme ou de son gène correspondant aussi bien à l'échelle industrielle qu'académique.
- 9- Une Glucose Isomérase, GI SK selon les revendications 1 à 8 incluant l'utilisation de cette enzyme sous toutes les formes possibles y compris, les cellules entières ou l'enzyme sous leur formes libres ou immobilisées.
- 10- Une Glucose Isomérase, GI SK selon les revendications 1 à 5 incluant l'utilisation de cette enzyme pour la bioconversion d'un sirop de glucose en sirop d'isoglucose (mélange de fructose et de glucose). Nous entendons par sirop de glucose tout sirop obtenu à partir d'un hydrolysât d'amidon, de maïs, de blé, d'orge ou de tout autre produit ou sous produits amylacés tels que le gruau.



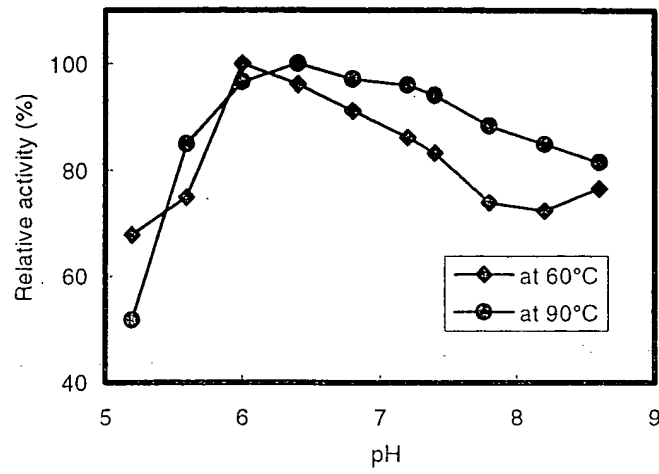
Ben

## RESUME

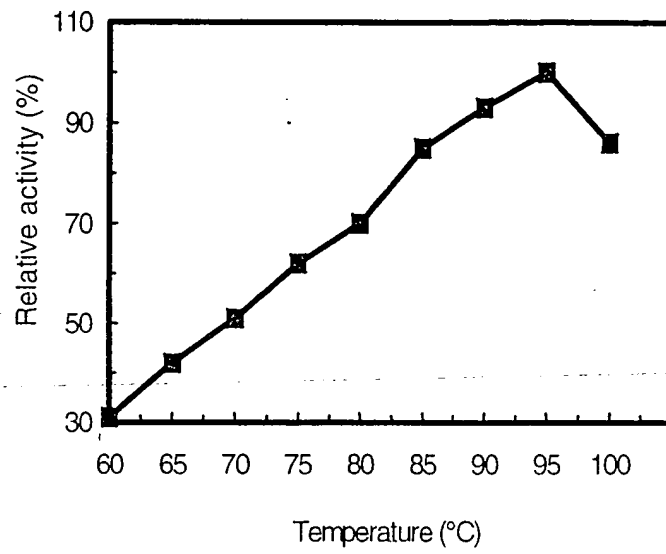
la caractérisation et l'utilisation d'une glucose isomérase originale appelée GI SK. Cette enzyme a été découverte chez une souche de *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. SK) thermophile que nous avons isolé d'un échantillon de sol Tunisien. La GI SK possède des caractéristiques très intéressantes notamment celle qui concerne une activité spécifique importante ainsi que la tolérance de pH bas puisque l'optimum de pH est déterminé à 6.4 à 95°C. Cette dernière caractéristique, en plus de la thermoactivité, permet de réaliser la réaction d'isomérisation à un pH bas et une température élevée ce qui est très recherché à l'échelle industrielle. Nous décrivons également le clonage du gène codant pour cette enzyme ainsi que la séquence nucléotidique et celle en aa de l'enzyme. Cette dernière se caractérise par quelques originalités qui peuvent expliquer les caractéristiques intéressantes de l'enzyme et ce en comparaison avec d'autre glucose isomérases. Parmi ces originalités, la substitution G<sub>103</sub> → Ala<sub>103</sub>.



Be



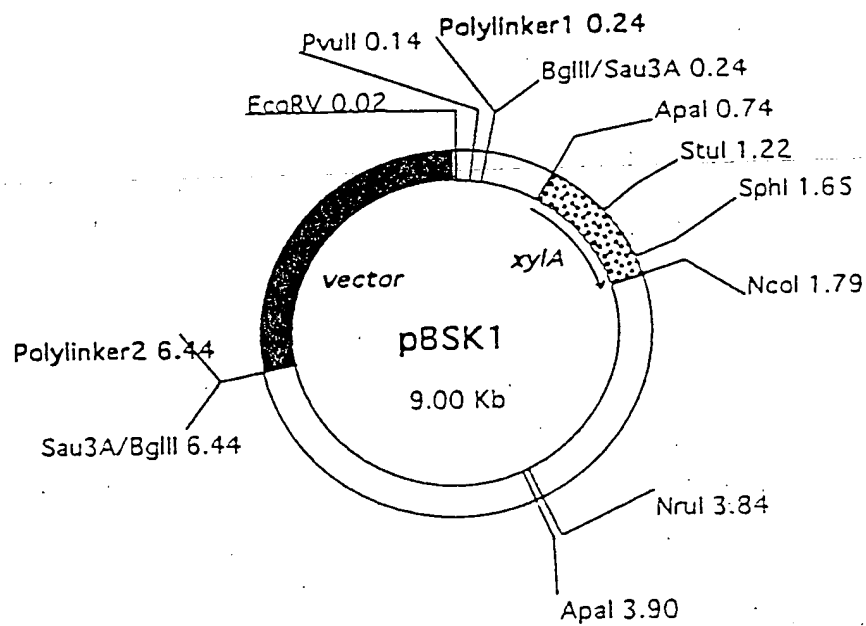
**Figure 1:** effet du pH sur la GI SK



**Figure 2 : effet de la température sur la GI SK**



*originale*



Polylinker1 : 0.24/NruI.StuI.XhoI.

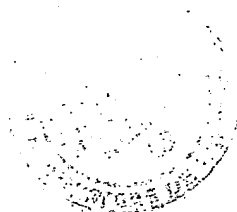
Polylinker2 : 6.44/ApaI.SfiI.XmaI.ClaI.SphI.NcoI.KpnI.SstI.EcoRI.HindIII.PstI.BamHI.

Figure 3: carte de restriction du plasmide pBSK1



CTGGGACGGTCTCGGACAG 20  
 GGGCTGCCCACTGGCGGGGTGGCTCTCCGGCGGTGGCGGTGGGAGCGGTGGGGGTGGCTGGCGGTGGCCAGACCGGGGTGGCGGTGGGAG 120  
 CACGAGCGGCTTGGTGGACTGGGTGGACGAGTCCACACCGACGAGGAGGGGAGCGCTCGGGTGGTGACATCGGGCTCTCCCTCTTTTTCGGGCTCAGGGG 220  
 CTGTGACCTCGGGCTTCAAGCTATGCCGGGGCTGTGGGCGCGGGGTGGGAGCCCGGGCGGGCGGGTTCCTGCTTCGGGCTTCCTTCACAGGAGCGGG 320  
 TCGGCATACTAATTTGTAATCGCCCTGACGAAATAGTGGCAAGCGAGCAAGGAGTCGGGGCATGAACCTACAGCCACCCCGAGGATAGGTTACCTTT 420  
 M N Y Q P T P E D R E T F 13  
 CGGCTGTGGACCGTGGGTGGCAAGGGCGGACCCCTTCGGCGACCGCACGGCTCCGGCGCTCGACCGGTGGAGCGGCTGCAGCGGTGGCGGACTG 520  
 G L W T V G W Q G R D P F G D A T R P A L D P V E A V Q R L A E L 46  
 GGGCTACGGAGTGAACCTTCCAGGACGACGACCTGATCCCTTCGGGGGTGGGAGACCGGAGCGGACGTCAGCGGTCAAGCGGTTCCTCAGGCGCTCG 620  
 G A Y G V T F H D D D L I P F G A S D T E R E A H V K R P F E Q A L 80  
 ACGGACCGGCGATACCGTTCGGATGGGACACCAACCTCTTCACCCACCGCGTCTTCAAGGACGGCGGTTACCGCGCAACGACCGGCGAGTGGCGCG 720  
 D A T G M T V P M A T T N L E T H P V E K D G A E T A N D R D V R R 113  
 TTACGGCTTCGCAAGACCATCCGAACATCGATCTCGGGGTGGAGCTGGGCGCAAGGTCTACGTGGCTGGGGCGGGCGGAGGCGCGGAGTCCGGT 820  
 Y A L R K T I R N I D L A V E L G A E V Y V A W G G R E G A E S G 146  
 CCGTCAAGGAGTGGCTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAG 920  
 A A K L V R A A L D R M K E A F D L L G E Y V T S Q G Y D I R F A 179  
 TGAAGGCAAGGAG 1020  
 I E P K P N E P R G D I L L P T I G H A L A F I E R I E R P E L Y G 213  
 GTCATCTCAAGGAGTGGCTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGG 1120  
 Y H P E V G H E Q M A G L E F F H I A Q A L W A G E L F H I D L 246  
 AAGGCGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGG 1220  
 S G Q D I E Y D D L E F G A D L R A A F W L V L L E S A G 279  
 GGAAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAG 1320  
 W E G P P H E F E K P P R T E D I L G V W A S A A G C R R E Y L I L 313  
 GAAAGGAG 1420  
 K E P A A A F R A D F E V Q E A L F A A R L D Q L A E F T A A D G 346  
 CTGAGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGG 1520  
 L Q A I I A D E T A T E L P D Y D A A A A F G H A F E F L I Q L A 379  
 TGAAGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGG 1620  
 H D H L L G A E G 399  
 GGGGCGGAGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAGTGGGCGGAG 1720

Figure 4: séquence nucléotidique du gène *xylA* SK et séquence en acides aminés de la protéine GI SK déduite à partir de la séquence nucléotidique



*Be*

XYLA-STRSK	.....A <sub>63</sub> .....	A <sub>70</sub> .....	A <sub>103</sub> .....	A <sub>333</sub> .....
XYLA-STROL	.....S <sub>63</sub> .....	S <sub>70</sub> .....	G <sub>103</sub> .....	S <sub>333</sub> .....
XYLA-STRVO	.....S <sub>63</sub> .....	S <sub>70</sub> .....	G <sub>103</sub> .....	A <sub>333</sub> .....
XYLA-ACTMI	.....S <sub>63</sub> .....	G <sub>70</sub> .....	G <sub>103</sub> .....	S <sub>333</sub> .....
XYLA-AMPSP	.....A <sub>63</sub> .....	G <sub>70</sub> .....	G <sub>103</sub> .....	S <sub>333</sub> .....
XYLA-THETH	.....K <sub>110</sub> .....	K <sub>122</sub> .....	A <sub>154</sub> .....	D <sub>380</sub> .....

Figure 5 : Les substitutions les plus importantes révélés après la comparaison de la GI SK (XYLA SK) avec d'autres glucoses isomérases. XYLA- STROL: glucose isomérase de *Streptomyces olivochromogenes*; XYLA-STRVO: glucose isomérase de *Streptomyces violaceoniger*; XYLA-ACTMI: glucose isomérase d' *Actinomycetes missouriensis*; XYLA-AMPSP: glucose isomérase *Ampulariella* sp. et XYLA-THETH: glucose isomérase de *thermus thermophilus*

